



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAÎTE DE COOPÉRATION EN MATERIE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : G01N 33/53, 33/566, 33/483, 33/487		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/54731 (43) Date de publication internationale: 28 octobre 1999 (28.10.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/00915			(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) Date de dépôt international: 19 avril 1999 (19.04.99)			
(30) Données relatives à la priorité: 98/04924 20 avril 1998 (20.04.98)		FR	
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): DIGIBIO S.A. [FR/FR]; 34, avenue des Champs Elysées, F-75008 Paris (FR).			
(72) Inventeurs; et			
(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): BENVENISTE, Jacques [FR/FR]; 3, rue Larochelle, F-75014 Paris (FR). GUILLONNET, Didier [FR/FR]; 121, chemin du Val de Cagnes, F-06800 Cagnes-sur-Mer (FR).			

(54) Title: METHOD FOR AMPLIFYING THE FORMATION OF LIGAND-RECEPTOR COMPLEXES AND USES

(54) Titre: PROCEDE D'AMPLIFICATION DE LA FORMATION DE COMPLEXES LIGANDS-RECEPTEURS ET SES UTILISATIONS

(57) Abstract

The invention concerns a method for amplifying the formation of complexes between the two elements of a ligand/receptor pair and its uses for detecting the presence of a substance corresponding to one of the two elements of a ligand/receptor pair in a sample and the electromagnetic signal characteristic of a substance biological activity corresponding to one of the two elements of a ligand/receptor pair in an electromagnetic signal. Said amplification method consists in: contacting the two elements of the ligand/receptor pair in conditions ensuring their reaction; prior to, simultaneously with or subsequent to said contacting, applying to one and/or the other of said elements an electromagnetic signal characteristic of the biological activity of one and/or the other of said elements. The invention is applicable to biological diagnosis in human and veterinary medicine, bacteriological control in the pharmaceutical, cosmetic and food industry.

(57) Abrégé

L'invention se rapporte à un procédé d'amplification de la formation de complexes entre les deux éléments d'un couple ligand/récepteur ainsi qu'à ses utilisations pour détecter la présence, d'une part, d'une substance correspondant à l'un des deux éléments d'un couple ligand/récepteur dans un échantillon et, d'autre part, du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'une substance correspondant à l'un des deux éléments d'un couple ligand/récepteur dans un signal électromagnétique. Ce procédé d'amplification comprend: la mise en contact des deux éléments du couple ligand/récepteur dans des conditions propres à permettre leur réaction; et préalablement, simultanément ou postérieurement à cette mise en contact, l'application à l'un et/ou l'autre de ces éléments du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'un et/ou l'autre desdits éléments. Applications: diagnostic biologique en médecine humaine et vétérinaire, contrôle bactériologique dans l'industrie pharmaceutique, l'industrie cosmétique, les productions et industries alimentaire, etc.

BEST AVAILABLE COPY

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

PROCEDE D'AMPLIFICATION DE LA FORMATION DE COMPLEXES LIGANDS-RECEPTEURS ET SES UTILISATIONS

La présente Invention se rapporte à un procédé d'amplification de la formation de complexes entre les deux éléments d'un couple ligand/récepteur, à un procédé et à un appareil de détection de la présence, dans un échantillon (ci-après "échantillon analytique"), d'une substance correspondant à l'un des deux éléments d'un couple ligand/récepteur, mettant en oeuvre ce procédé d'amplification, aux applications de ce procédé de détection, ainsi qu'à un procédé de détection de la présence, dans un signal électromagnétique, du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'une substance correspondant à l'un des deux éléments d'un couple ligand/récepteur, mettant également en oeuvre ledit procédé d'amplification.

Pour détecter la présence d'une substance dans un échantillon analytique, on a proposé de très nombreuses méthodes fondées sur la capacité de cette substance à se lier spécifiquement à une autre substance et à réagir avec elle.

En particulier, les propriétés d'affinité que présentent les anticorps vis-à-vis des antigènes sont à la base d'un grand nombre de méthodes immunologiques de détection qui ont en commun d'utiliser la formation de complexes antigènes-anticorps - la substance recherchée pouvant être soit l'antigène, soit l'anticorps - et de détecter, voire de quantifier, les complexes ainsi formés.

A titre d'exemples de méthodes immunologiques de détection qui sont très fréquemment utilisées, on peut citer l'immunoprécipitation, les réactions d'agglutination, la dialyse à l'équilibre, l'extinction de fluorescence, la polarisation de fluorescence, l'immunoélectrophorèse, la contre-immunoélectrophorèse ou électrosynthèse, les dosages radio-immunologiques (RIA), les dosages immuno-enzymatiques (ELISA) ou encore l'immunofluorescence.

Ces méthodes immunologiques de détection, si elles présentent incontestablement de grandes qualités, ne donnent toutefois pas totalement satisfaction.

En premier lieu, leur sensibilité (qui est définie par la concentration minimale de substance recherchée que ces méthodes détectent) est, dans la plupart des cas, insuffisante. Ainsi, BERZOF SKY et BERKOWER (*Antigen-Antibody Interaction*, In : WE Paul, *Fundamental Immunology*, RAVEN PRESS, New-York, 5 1984, 595) ont montré que, pour ce qui concerne par exemple la détection des anticorps, à l'exception des tests de neutralisation des phages avec lesquels il est possible de détecter la présence d'une seule molécule d'anticorps mais dont l'usage est extrêmement limité, très peu de méthodes ont une sensibilité inférieure à 10 ng d'anticorps par ml d'échantillon.

10 Il est donc souhaitable de développer de nouvelles techniques qui permettent d'abaisser le seuil de détection d'une substance recherchée.

Par ailleurs, toutes les méthodes de détection immunologiques proposées à ce jour comprennent une étape qui consiste à incuber un volume déterminé - qui est généralement au minimum de 500 µl - du prélèvement à analyser 15 avec un réactif spécifique et ce, pour chaque substance recherchée. De ce fait, elles présentent l'inconvénient de nécessiter, dès que l'analyse d'un prélèvement porte sur plusieurs substances - comme cela est très souvent le cas des analyses médicales à visée diagnostique -, un prélèvement d'un volume relativement important, ce qui n'est pas toujours bien supporté par les patients, notamment dans le cas de prélèvements 20 sanguins.

De plus, le fait que ces méthodes de détection nécessite, pour leur mise en oeuvre, de disposer du prélèvement à analyser ou, à tout le moins, d'un échantillon de celui-ci, n'est pas sans présenter un certain nombre de contraintes. En effet :

25 – d'une part, il est fréquent que des prélèvements ayant donné lieu à des analyses doivent être conservés de manière à ce que la fiabilité de ces analyses puisse être contrôlée ultérieurement ou que des analyses complémentaires puissent être réalisées. Ainsi, par exemple, les centres de transfusion sanguine, les services de médecine légale et les centres de prélèvements tissulaires conservent des échantillons 30 de tous les prélèvements biologiques qu'ils sont amenés à effectuer. Cette

conservation, qui est réalisée par congélation desdits échantillons, outre d'avoir un coût non négligeable, nécessite des équipements et des locaux adaptés.

– d'autre part, il est également fréquent que des prélèvements ne puissent pas être analysés sur le lieu où ils ont été réalisés et qu'il soit nécessaire de les 5 acheminer jusqu'au laboratoire chargé d'en effectuer l'analyse. Or, l'acheminement de prélèvements biologiques, outre qu'il n'est jamais très aisément à mettre en oeuvre en raison de la faible durée de conservation des substances biologiques en l'absence de congélation, pose un certain nombre de difficultés lorsque ces prélèvements sont potentiellement contaminants. De plus, la durée d'un tel acheminement diffère d'autant 10 l'obtention des résultats de l'analyse.

Le problème se pose, par conséquent, de fournir une méthode qui permette de détecter la présence d'une substance dans un échantillon avec, à la fois, une très grande sensibilité et une haute spécificité, tout en offrant la possibilité d'effectuer autant d'analyses que nécessaires à partir de microprélèvements, de 15 s'affranchir, de plus, des contraintes de conservation, d'expédition et de transport des prélèvements que présentent les méthodes actuellement utilisées pour la détection d'une substance, et qui puisse, en outre, être mise en oeuvre aisément et rapidement sans nécessiter un équipement lourd et onéreux.

Or, dans le cadre de leurs travaux sur la transmission d'une activité 20 biologique sous la forme d'un signal électromagnétique, les Inventeurs ont constaté que l'application, à l'un et/ou l'autre des éléments d'un couple ligand/récepteur tel qu'un couple antigène/anticorps, du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'un et/ou l'autre de ces éléments a, de façon tout à fait surprenante, pour effet d'amplifier la formation de complexes entre les deux éléments 25 de ce couple lorsque ces derniers sont mis à réagir ensemble et ce, de manière très spécifique, et ont eu l'idée de mettre à profit cet effet pour détecter d'une part, la présence d'une substance dans un échantillon analytique et, d'autre part, la présence du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'une substance dans un rayonnement électromagnétique.

La présente Invention a, donc, pour objet un procédé d'amplification de la formation de complexes entre les deux éléments d'un couple ligand/récepteur par réaction de ces deux éléments, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact des deux éléments du couple ligand/récepteur
- 5 dans des conditions propres à permettre leur réaction, et
 - préalablement, simultanément ou postérieurement à cette mise en contact, l'application à l'un et/ou l'autre de ces éléments du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'un et/ou l'autre desdits éléments.

Au sens de la présente Invention, on entend par "couple ligand/récepteur", tout couple formé par deux substances capables de se reconnaître spécifiquement, de se lier et de réagir ensemble en formant des complexes. Ainsi, il peut s'agir d'un couple antigène/anticorps ou haptène/anticorps dans lequel le ligand (l'antigène ou l'haptène) peut être un composé biologique (protéine, enzyme, hormone, toxine, marqueur tumoral, ...), un composé chimique (principe actif médicamenteux par exemple), ou un antigène cellulaire ou particulaire (cellule, bactérie, virus, champignon, ...), le récepteur pouvant être un anticorps soluble ou un récepteur membranaire. Il peut également s'agir d'un couple formé par une enzyme et son substrat spécifique.

Par ailleurs, on entend par "signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique" d'un élément, le signal électromagnétique capté à partir d'un élément biologiquement actif tel qu'une substance, une cellule ou un micro-organisme, ..., ou d'une matière contenant cet élément tel qu'une préparation purifiée, un prélèvement biologique, un organe ou un être vivant, ainsi que cela a été décrit dans la Demande Internationale WO 94/17406 au nom de J. BENVENISTE. On entend également par "signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique" d'un élément, les signaux dérivés d'un signal tel que défini ci-dessus par numérisation et/ou traitement de signal. Par ailleurs, dans cette expression, on emploie le terme "caractéristique" dans le sens où le signal électromagnétique capté contient une information caractérisant le fait que la matière à partir de laquelle est capté ce signal présente l'activité biologique en question. Le signal électromagnétique capté à partir

d'un matériel contenant une pluralité d'éléments biologiquement actifs présente l'activité biologique de chacun des éléments qu'il contient.

Selon un premier mode de mise en œuvre préféré du procédé d'amplification conforme à l'Invention, la réaction entre le ligand et le récepteur est réalisée en utilisant deux réactifs contenant respectivement le ligand et le récepteur, et on applique, à l'un et/ou l'autre de ces réactifs, un signal électromagnétique à tester et suspecté comprendre le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de ce ligand et/ou de ce récepteur.

Dans ce qui précède et dans ce qui suit, on désigne sous le terme de "réactif", toute préparation dont la composition est connue, qui contient le ligand ou le récepteur en une quantité également connue et se présente soit sous une forme sèche telle qu'un lyophilisat à reconstituer dans un solvant, soit sous une forme liquide telle qu'une solution ou une suspension, le ligand ou le récepteur pouvant être fixé sur une phase solide (particules ou billes de latex, de verre ou de polystyrène, ...).

Selon une première disposition avantageuse de ce premier mode de mise en œuvre, l'application, à l'un et/ou l'autre des réactifs, du signal électromagnétique à tester est réalisée par exposition d'une solution ou d'une suspension contenant l'un et/ou l'autre de ces réactifs, à ce signal électromagnétique.

En variante, l'application, à l'un et/ou l'autre des réactifs, du signal électromagnétique à tester est réalisée par dilution d'une solution ou d'une suspension comprenant l'un et/ou l'autre de ces réactifs, dans un solvant ayant été préalablement exposé à ce signal électromagnétique.

Ainsi, par exemple, lorsque les réactifs que l'on souhaite utiliser sont en solution ou en suspension dans une phase liquide, il est possible de leur appliquer le signal électromagnétique à tester :

- * soit préalablement à leur utilisation :
 - en exposant l'un et/ou l'autre de ces réactifs ou des aliquotes de l'un et/ou l'autre de ces réactifs à ce signal électromagnétique, ou
 - en diluant l'un et/ou l'autre desdits réactifs ou leurs aliquotes dans un volume d'un solvant ayant été préalablement exposé au dit signal électromagnétique,

* soit lors de la mise en oeuvre du procédé d'amplification conforme à l'Invention :

- en exposant à ce signal électromagnétique un aliquote de chacun de ces réactifs, après dépôt de ces aliquotes sur un support (lame par exemple) mais préalablement à leur mise en contact, ou
- en mélangeant un aliquote du premier réactif avec un aliquote du deuxième réactif sur un support ou dans un tube, et en exposant ce mélange au signal électromagnétique, ou encore
- en mélangeant un aliquote du premier réactif avec un aliquote du deuxième réactif sur un support ou dans un tube et en diluant ce mélange dans un volume d'un solvant ayant été préalablement exposé audit signal électromagnétique.

Selon une autre disposition avantageuse de ce premier mode de mise en oeuvre, l'application, à l'un et/ou l'autre des réactifs, du signal électromagnétique à tester est réalisée par dissolution ou mise en suspension de ce ou ces réactifs dans un solvant ayant été préalablement exposé à ce signal électromagnétique. Cette disposition présente un intérêt tout particulier lorsque les réactifs que l'on souhaite utiliser, se trouvent sous une forme déshydratée telle qu'un lyophilisat, puisqu'il est alors possible de leur appliquer le signal électromagnétique à tester simplement en les dissolvant ou en les mettant en suspension selon le cas, dans un volume d'un solvant ayant été préalablement exposé à ce signal électromagnétique.

Avantageusement, le signal électromagnétique à tester est un signal électromagnétique capté à partir d'un échantillon à analyser et suspecté contenir ce ligand et/ou ce récepteur, cet échantillon pouvant être aussi bien issu d'un prélèvement biologique (sang, urine, lait, ...) que d'un prélèvement non biologique (eau, produit alimentaire, produit pharmaceutique, produit cosmétique, ...).

En variante, le signal électromagnétique à tester peut également être un signal électromagnétique rayonné par une source de rayonnement électromagnétique, notamment une source suspectée émettre un rayonnement nocif pour les êtres vivants du type ligne haute-tension, transformateur, moteur électrique, four à micro-ondes, accélérateur de particules, source de rayons X, ... De même, le

signal électromagnétique à tester peut provenir de l'acquisition d'un signal mécanique comme des vibrations, d'un signal electrostatique ou autre.

Selon un deuxième mode de mise en oeuvre préféré du procédé d'amplification conforme à l'Invention, la réaction entre le ligand et le récepteur est réalisée en mettant en contact un échantillon à analyser et suspecté contenir le ligand et/ou le récepteur, avec un réactif contenant soit le récepteur, soit le ligand (selon la substance suspectée être présente dans l'échantillon analytique avec laquelle on souhaite faire réagir ce réactif), et on applique, à cet échantillon et/ou à ce réactif, le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique dudit ligand et/ou dudit récepteur.

Selon une première disposition avantageuse de ce deuxième mode de mise en oeuvre, l'application, à l'échantillon à analyser, du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique du ligand et/ou du récepteur est réalisée par exposition de cet échantillon à ce ou ces signaux électromagnétiques, ou par dilution de cet échantillon dans un solvant ayant été préalablement exposé au(x)dit(s) signal(aux) électromagnétique(s).

Selon une autre disposition avantageuse de ce deuxième mode de mise en oeuvre, l'application, au réactif destiné à réagir avec l'échantillon à analyser, du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique du ligand et/ou du récepteur est réalisée par exposition d'une solution ou d'une suspension contenant ce réactif à ce ou ces signaux électromagnétiques, ou par dilution d'une telle solution ou suspension dans un solvant ayant été préalablement exposé à ce ou ces signaux électromagnétiques, ou encore par dissolution ou mise en suspension de ce réactif dans un solvant ayant été préalablement exposé au(x)dit(s) signal(aux) électromagnétique(s).

En variante, on applique, à l'échantillon à analyser et au réactif destiné à réagir avec lui, le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique du ligand et/ou du récepteur, par exposition d'une solution ou d'une suspension contenant cet échantillon et ce réactif à ce ou ces signaux électro-

magnétiques, ou par dilution d'une telle solution ou suspension dans un solvant ayant été préalablement exposé au(x)dit(s) signal(aux) électromagnétique(s).

Selon une disposition particulièrement préférée de ce deuxième mode de mise en oeuvre, on applique, à l'échantillon à analyser et/ou au réactif destiné à réagir avec lui, à la fois le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique du ligand et le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique du récepteur. En effet, les Inventeurs ont constaté que, s'il suffit d'appliquer, aux éléments du couple ligand/récepteur, le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'un seul de ces éléments pour obtenir une amplification des complexes formés par leur réaction, cette amplification est plus élevée lorsqu'on applique à ces éléments simultanément les signaux électromagnétiques caractéristiques de l'activité biologique de chacun d'eux.

Quel que soit le mode de mise de oeuvre du procédé d'amplification conforme à l'Invention, le solvant ayant été préalablement exposé au(x) signal(aux) électromagnétique(s) est avantageusement de l'eau ou du soluté physiologique.

Les réactifs susceptibles d'être utilisés dans le procédé d'amplification conforme à l'Invention et contenant le ligand d'une part, et le récepteur d'autre part, peuvent être aussi bien des réactifs prêts à l'emploi disponibles dans le commerce que des réactifs spécialement conçus et préparés pour la mise en oeuvre de ce procédé. Outre le fait que, comme mentionné ci-avant, ces réactifs peuvent se présenter sous différentes formes (sèche, liquide, ...), ils peuvent, par ailleurs, être couplés à un marqueur tel qu'un isotope radioactif, une enzyme, une substance fluorescente, une particule colorée, la biotine ou un composé organométallique, propre à permettre la détection et/ou la mesure des complexes ligands-récepteurs résultant de la réaction entre le ligand et le récepteur.

Le procédé d'amplification comprend avantageusement, de plus, une étape d'acquisition du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'un et/ou l'autre des éléments du couple ligand/récepteur.

Comme précédemment indiqué, le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'un et/ou l'autre des éléments du couple

ligand/récepteur peut provenir soit d'un échantillon à analyser et suspecté contenir ce ou ces éléments, soit d'une source de rayonnement électromagnétique ou de l'acquisition d'un signal mécanique (vibrations), électrostatique ou autre, soit encore de réactifs contenant le ligand ou le récepteur en solution ou en suspension dans un solvant, selon les modes de mises en oeuvre du procédé d'amplification conforme à l'Invention.

De manière particulièrement avantageuse, le procédé d'amplification conforme à l'Invention comprend, également, une étape d'enregistrement et de restitution d'une information représentative du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'un et/ou l'autre des éléments du couple ligand/récepteur. Ainsi, le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'un échantillon analytique, une fois enregistré, peut être conservé indéfiniment et utilisé autant de fois que nécessaire. De manière similaire, les signaux électromagnétiques caractéristiques de l'activité biologique du ligand et de l'activité biologique du récepteur captés à partir de réactifs, peuvent être enregistrés une fois pour toutes et être utilisés pour effectuer une pluralité de réactions mettant en jeu ce ligand et ce récepteur.

Le procédé d'amplification comprend avantageusement, en outre, une étape de détection des complexes résultant de la réaction entre le ligand et le récepteur et, éventuellement, de mesure de ces complexes. Cette étape peut, avantageusement, être complétée par la comparaison des résultats obtenus avec ceux observés pour une réaction servant de "témoin", c'est-à-dire une réaction conduite avec le même couple ligand/récepteur et dans les mêmes conditions réactionnelles, mais sans application d'un signal électromagnétique aux éléments de ce couple, que ce soit préalablement, simultanément ou postérieurement à leur mise en contact.

La détection et/ou la mesure des complexes ligands-récepteurs sont susceptibles d'être effectuées par toutes les méthodes classiquement utilisées pour révéler et quantifier la formation de tels complexes. Ainsi, dans le cas de complexes antigènes-anticorps, il est possible d'utiliser aussi bien une révélation par agglutination, par immunoprécipitation, par extinction de fluorescence, par

polarisation de fluorescence qu'un test radio-immunologique, immuno-enzymatique ou encore un test d'immuno-fluorescence.

Selon un mode de mise en oeuvre particulièrement préféré du procédé d'amplification conforme à l'Invention, le ligand est un antigène ou un haptène, tandis que le récepteur est un anticorps ou un récepteur membranaire dirigé spécifiquement contre ce ligand.

De manière particulièrement avantageuse, la réaction entre ce ligand et ce récepteur est une réaction révélée par agglutination, du fait de sa simplicité et de sa rapidité d'exécution.

La présente Invention a, également, pour objet un procédé de détection de la présence d'une substance correspondant à l'un des deux éléments d'un couple ligand/récepteur dans un échantillon analytique, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en oeuvre d'un procédé d'amplification tel que défini ci-dessus.

Selon un premier mode de mise en oeuvre particulièrement préféré de ce procédé de détection, celui-ci comprend :

- la mise en contact de deux réactifs contenant respectivement le ligand et le récepteur, dans des conditions propres à permettre leur réaction,
- préalablement, simultanément ou postérieurement à cette mise en contact, l'application, à l'un et/ou l'autre de ces réactifs, du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'échantillon analytique, et
- la détection et/ou la mesure des complexes ligands-récepteurs formés au cours de la réaction entre les deux réactifs.

Ainsi, l'obtention d'une amplification de la formation de complexes ligands-récepteurs entre les deux réactifs par rapport à une réaction "témoin" (telle que précédemment définie) traduit la présence, dans le signal électromagnétique de l'activité biologique de l'échantillon à analyser, du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de la substance recherchée et, par voie de conséquence, traduit la présence, dans cet échantillon, de la substance recherchée.

Dans le cas où une telle amplification est obtenue et où l'échantillon analytique est susceptible de contenir non pas un seul des deux éléments du couple

ligand/récepteur, mais ces deux éléments, la présence, dans cet échantillon, de la substance recherchée peut être confirmée par la comparaison des résultats obtenus avec :

- soit ceux observés pour une réaction conduite dans les mêmes conditions réactionnelles mais avec une application à la fois du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'échantillon à analyser et du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique du ligand,
- soit ceux observés pour une réaction conduite dans les mêmes conditions réactionnelles mais avec une application à la fois du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'échantillon à analyser et du signal caractéristique de l'activité biologique du récepteur.

Ainsi, si l'application simultanée du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'échantillon analytique et du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique du ligand se traduit par une amplification de la formation des complexes ligands-récepteurs par rapport à l'application du seul signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique dudit échantillon analytique, alors cela signifie que cet échantillon ne contient pas de ligand et donc ne contient que le récepteur. L'absence d'augmentation de la formation des complexes ligands-récepteurs signant, elle, la présence du ligand dans l'échantillon analytique.

De manière similaire, si l'application simultanée du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'échantillon analytique et du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique du récepteur se traduit par une amplification de la formation des complexes ligands-récepteurs par rapport à l'application du seul signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique dudit échantillon analytique, alors il peut en être déduit que cet échantillon ne contient pas de récepteur et donc ne contient que le ligand. L'absence d'augmentation de la formation des complexes ligands-récepteurs signant, elle, la présence du récepteur dans l'échantillon.

Afin d'éviter d'obtenir des résultats faussement négatifs, c'est-à-dire des résultats qui ne permettraient pas de révéler un effet d'amplification de l'application du signal électromagnétique caractéristique de l'activité de l'échantillon analytique et ce, bien que ce dernier contienne en réalité la substance recherchée, les 5 concentrations du ligand et du récepteur mis à réagir sont avantageusement choisies de manière à être suffisantes pour conduire à l'obtention de complexes ligands-récepteurs détectables en l'absence de l'application du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique dudit échantillon, mais inférieures aux concentrations susceptibles d'aboutir à une saturation de la réaction entre ce ligand et ce récepteur.

10 Selon un deuxième mode de mise en oeuvre préféré de ce procédé de détection, celui-ci comprend :

- la mise en contact de l'échantillon analytique avec un réactif contenant soit le récepteur, si la substance recherchée dans l'échantillon est le ligand, soit le ligand, si la substance recherchée dans l'échantillon est le récepteur, dans des 15 conditions propres à permettre leur réaction,
- préalablement, simultanément ou postérieurement à cette mise en contact, l'application, à cet échantillon et/ou ce réactif, du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique du ligand et/ou du récepteur, et
- la détection et/ou la mesure des complexes ligands-récepteurs 20 éventuellement formés, auquel cas, l'obtention de complexes ligands-récepteurs traduit la présence de la substance recherchée dans l'échantillon analytique.

Ce deuxième mode de mise en oeuvre préféré présente un intérêt tout particulier pour détecter la présence de substances dans des échantillons, dont on sait qu'elles ne sont pas détectables ou que très difficilement par les autres méthodes 25 de détection disponibles, en raison de ce que ces substances sont généralement présentes à des concentrations très faibles, voire à l'état de traces.

Le procédé de détection de la présence d'une substance dans un échantillon analytique conforme à l'Invention présente de nombreux avantages.

En effet, d'une part, il permet de détecter la présence d'une substance 30 recherchée avec une très grande sensibilité et une haute spécificité. De ce fait, dans le

cas, par exemple, d'une analyse bactériologique, il permet de supprimer la nécessité d'isoler les différents germes, de les cultiver, de procéder à un antibiogramme et d'identifier ces germes par leurs caractères biochimiques, morphologiques et immunologiques, et autorise l'obtention de résultats beaucoup plus rapidement que les 5 méthodes de détection immunologiques actuellement utilisées en bactériologie.

D'autre part, dans la mesure où il suffit de disposer d'un échantillon de la taille d'une goutte pour être en mesure d'acquérir et d'enregistrer le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de cet échantillon et où, ce signal, une fois enregistré peut être restitué à la demande, ce procédé offre la 10 possibilité de réaliser autant d'analyses que l'on souhaite à partir d'un microprélèvement.

Enfin, l'enregistrement d'un signal électromagnétique pouvant être conservé indéfiniment, par exemple sous la forme d'un fichier informatique susceptible d'être conservé sur une simple disquette ou un CD-Rom, et d'être transmis 15 d'un lieu à un autre par tout moyen de transmission de données numériques, ce procédé permet, de plus, de supprimer toutes les contraintes de conservation, d'expédition et de transport des prélèvements que présentent les méthodes actuellement utilisées pour la détection d'une substance.

Ce procédé est susceptible d'être utilisé pour détecter toute substance 20 capable de se lier spécifiquement avec une autre substance et de réagir avec elle, étant entendu que le terme "substance" tel qu'il est utilisé ici, désigne aussi bien un composé biologique, un composé chimique, une cellule qu'un micro-organisme du type bactérie, virus ou champignon, sachant notamment que pour tout haptène, protéine ou complexe protéinique, il est possible de trouver sur le marché ou de faire fabriquer les 25 anticorps correspondants. A ce titre, ce procédé trouve, notamment, application dans le diagnostic biologique, que ce soit en médecine humaine ou vétérinaire, ou pour le contrôle de qualité bactériologique dans les industries telles que l'industrie pharmaceutique, l'industrie cosmétique, les productions et industries alimentaires.

La présente Invention a, encore, pour objet un procédé de détection 30 de la présence, dans un signal électromagnétique à tester, d'un signal

électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'une substance correspondant à l'un des deux éléments d'un couple ligand/récepteur, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend la mise en oeuvre d'un procédé d'amplification tel que défini ci-dessus.

5 Selon un mode de mise en oeuvre préféré de ce procédé de détection, le signal électromagnétique à tester est le signal électromagnétique rayonné par une source de rayonnement électromagnétique.

L'Invention a, aussi, pour objet un appareil de détection de la présence d'une substance correspondant à l'un des deux éléments d'un couple 10 ligand/récepteur dans un échantillon analytique, lequel appareil est caractérisé en ce qu'il met en œuvre un procédé selon l'Invention et en ce qu'il comporte :

- a) des moyens de réception de l'échantillon analytique et d'un réactif contenant soit le récepteur, soit le ligand, permettant leur mise en contact dans des conditions propres à permettre leur réaction ;
- 15 b) une source de signal électromagnétique caractéristique de l'activité du ligand et/ou du récepteur ;
- c) des moyens d'application du signal délivré par ladite source de signal électromagnétique à l'échantillon et/ou le réactif ; et
- d) des moyens de détection et/ou de mesure des complexes 20 ligands-récepteurs formés au cours de la réaction entre l'échantillon et le réactif.

L'Invention a, en outre, pour objet un appareil de détection de la présence d'une substance correspondant à l'un des deux éléments d'un couple ligand/récepteur dans un échantillon analytique, lequel appareil est caractérisé en ce qu'il met en œuvre un procédé selon l'Invention et en ce qu'il comporte :

- 25 a) des moyens de réception de deux réactifs contenant respectivement le ligand et le récepteur, permettant leur mise en contact dans les conditions propres à permettre leur réaction ;
- b) des moyens d'acquisition d'un signal électromagnétique de l'échantillon analytique ;

c) des moyens d'application du signal délivré par lesdits moyens d'acquisition de signal électromagnétique à l'un et/ou l'autre des réactifs ; et

d) des moyens de détection et/ou de mesure des complexes ligands-récepteurs formés en cours de la réaction entre les deux réactifs.

5 Selon un mode de réalisation avantageux de ces appareils, les moyens de détection comportent des moyens de détection optique.

De manière préférée, ces appareils comportent une enceinte munie d'un blindage électrique et magnétique entourant lesdits moyens de réception.

Outre les dispositions qui précédent, l'Invention comprend encore 10 d'autres dispositions qui ressortiront du complément de description qui suit, qui se rapporte à des exemples de réalisation de dispositifs d'acquisition, d'enregistrement et d'application de signal susceptibles d'être utilisés selon l'Invention ainsi qu'à des exemples d'expérimentations ayant permis de valider le procédé d'amplification objet de la présente Invention, et qui se réfère aux dessins annexés dans lesquels :

15 – la Figure 1 représente un schéma d'un premier exemple de réalisation d'un dispositif d'acquisition de signal susceptible d'être utilisé selon la présente Invention ;

20 – la Figure 2 représente un schéma d'un deuxième exemple de réalisation d'un dispositif d'acquisition de signal susceptible d'être utilisé selon la présente Invention ;

– la Figure 3 représente un schéma d'un premier exemple de réalisation d'un dispositif d'enregistrement de signal susceptible d'être utilisé selon la présente Invention ;

25 – la Figure 4 représente un schéma d'un deuxième exemple de réalisation d'un dispositif d'enregistrement de signal susceptible d'être utilisé selon la présente Invention ;

– la Figure 5 représente un schéma d'un exemple de réalisation d'un dispositif d'application de signal susceptible d'être utilisé conformément à l'Invention ;

30 – la Figure 6 montre une image noir et blanc de 320 pixels x 240 pixels des agglutinats formés au cours d'une réaction d'agglutination entre l'antigène

polysaccharidique d'*Escherichia coli* K1 et un anticorps dirigé contre cet antigène, après application du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de *Streptococcus* ;

– la Figure 7 montre une image noir et blanc de 320 pixels x 240 pixels des agglutinats formés au cours d'une réaction d'agglutination entre l'antigène polysaccharidique d'*Escherichia coli* K1 et un anticorps dirigé contre cet antigène, après application du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'*Escherichia coli* ;

– la Figure 8 montre une image noir et blanc de 320 pixels x 240 pixels des agglutinats formés au cours d'une réaction d'agglutination entre l'antigène polysaccharidique d'*Escherichia coli* K1 et un anticorps dirigé contre cet antigène, après application simultanée des signaux électromagnétiques caractéristiques de l'activité biologique de *Streptococcus* et de l'activité biologique d'un anticorps dirigé contre *Escherichia coli* ;

– la Figure 9 montre une image noir et blanc de 320 pixels x 240 pixels des agglutinats formés également au cours d'une réaction d'agglutination entre l'antigène polysaccharidique d'*Escherichia coli* K1 et un anticorps dirigé contre cet antigène, après application simultanée des signaux électromagnétiques caractéristiques de l'activité biologique d'*Escherichia coli* et de l'activité biologique de son anticorps spécifique ; et

– la Figure 10 représente un schéma d'un exemple de réalisation d'un dispositif de détection et/ou de mesure des complexes ligands-récepteurs susceptible d'être utilisé selon la présente Invention.

Sur les Figures 1 à 5 et 10, on a utilisé les mêmes références pour désigner les mêmes éléments.

Par ailleurs, chaque image des Figures 6 à 9 correspond à une surface d'environ 2 mm x 1,5 mm du support sur lequel ont été réalisées les réactions d'agglutination.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustrations de l'objet de l'Invention et n'en constituent en aucune manière une limitation.

On se réfère tout d'abord aux Figures 1 à 5.

Sur la Figure 1, on a représenté schématiquement un premier exemple de réalisation d'un dispositif d'acquisition du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'une substance 1 disposée dans un contenant 3, par exemple un tube à essai. Un capteur 5, typiquement une bobine de type "capteur téléphonique" commercialisé en vue d'être appliqué sur un écouteur téléphonique et relié à un magnétophone, est appliqué contre le contenant 3. Le contenant 3 peut également être constitué par une paroi biologique, notamment la peau d'un être vivant. Dans un tel cas, l'acquisition du signal électromagnétique s'effectue de manière non invasive.

Le signal recueilli par la bobine 5 est, avantageusement, amplifié par un amplificateur 7 et est disponible à une borne de sortie 9. Sans que cela présente un quelconque caractère limitatif de l'exemple illustré, une première extrémité de la bobine 5 est connectée à l'entrée de l'amplificateur-préamplificateur 7, l'autre extrémité opposée étant connectée à une masse 11. Dans un exemple de réalisation, la bobine 5 est un capteur téléphonique du commerce présentant une longueur de 6 mm, un diamètre interne de 6 mm contenant un noyau métallique, un diamètre externe de 16 mm et une impédance de 300 Ω.

Sur la Figure 2, on a représenté schématiquement l'exemple préféré de réalisation d'un dispositif d'acquisition du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'une substance 1 contenue dans un contenant 3, dans lequel le dispositif comprend, de préférence, dans une enceinte 13 munie d'un blindage électrique et magnétique, un transducteur 15 d'irradiation de ladite substance 1 alimenté par un générateur 17. Le transducteur 15 comporte, par exemple, une bobine, avantageusement complétée par des guides d'ondes, par exemple, un entrefer (non représenté) placé au contact des parois extérieures du contenant 3.

Le générateur 17 génère un signal sinusoïdal basse fréquence, des signaux carrés basse fréquence, du bruit rose ou, avantageusement, du bruit blanc. Le spectre du signal d'excitation alimentant la bobine 15 correspond sensiblement au spectre des fréquences audibles (20 Hz - 20 000 Hz). Le générateur 17 peut être un 5 générateur de signal analogique de type connu ou, par exemple, une mémoire morte (ROM, PROM, EPROM, EEPROM en terminologie anglo-saxonne) contenant le signal numérique du bruit désiré et qui est reliée à un convertisseur numérique-analogique, ou la sortie ligne d'une carte sons d'un micro-ordinateur multimédia. Toutefois, la mise en oeuvre de fréquences supérieures ne sort pas du cadre de la 10 présente Invention.

Le capteur d'acquisition 5 peut comporter une bobine analogue à la bobine 5 du dispositif de la Figure 1 ou, avantageusement, une bobine de petit diamètre relié par un guide d'ondes électromagnétiques à la paroi du contenant 3. Avantageusement, le signal capté par le capteur 5 est disponible à une borne de sortie 15 9 d'un amplificateur-préamplificateur 7.

Le signal disponible sur la borne 9 peut être directement appliqué à la ou aux substances à irradier, notamment au ligand, au récepteur ou au couple ligand/récepteur (notamment à l'aide du dispositif illustré sur la Figure 5 et décrit ci-après).

20 L'enregistrement du signal peut être effectué en analogique par un enregistreur de signal 19 (Figure 3), notamment sur bande magnétique 21 adapté aux fréquences du signal capté. Pour les fréquences acoustiques, on peut notamment utiliser un magnétophone. La borne de sortie 9 du dispositif d'acquisition de signal des Figures 1 ou 2 est reliée à l'entrée microphone ou à l'entrée ligne d'un tel 25 magnétophone. Lors de la lecture, le signal est recueilli à une borne de sortie 9', notamment à la sortie ligne ou à la sortie haut-parleur du magnétophone 19.

Avantageusement, on effectue un enregistrement numérique après conversion analogique-numérique du signal. On utilise, par exemple, un micro-ordinateur 23 illustré sur la Figure 4, muni d'une carte d'acquisition de signal 25. Il 30 s'agit par exemple d'un ordinateur de type PC, tournant sous le système d'exploitation

WINDOWS® 95 de la Société MICROSOFT et comportant, outre la carte d'acquisition 25, un microprocesseur 27, un interface d'entrée/sortie 29, un contrôleur 31 d'une mémoire de masse 33 et une interface vidéo 35 reliée par un ou plusieurs bus 37. La carte d'acquisition 25 comporte un convertisseur analogique 39 ayant, de 5 préférence, une résolution supérieure à 10 bits, par exemple égale à 12 bits, ainsi qu'une fréquence d'échantillonnage double de la fréquence maximale que l'on veut pouvoir numériser pour le traitement de signaux. Dans les fréquences acoustiques, la fréquence d'échantillonnage est avantageusement sensiblement égale à 44 kHz. Pour le 10 traitement de ces types de signaux, on utilise avantageusement une carte son pour micro-ordinateur, par exemple la carte Soundblaster 16 ou la carte Soundblaster 32 vendues par la Société CREATIVE LABS. L'ordinateur 23 muni de la carte d'acquisition de restitution 25, notamment d'une carte Soundblaster 32 peut 15 avantageusement remplacer le générateur de signal 17 de la Figure 2.

On connecte la sortie 9 des dispositifs d'acquisition de signal des 15 Figures 1 à l'entrée 9 du convertisseur analogique-numérique 39 de la carte 25 de l'ordinateur 23 ; on procède à une acquisition du signal pendant une durée par exemple comprise entre 1 et 60 s et on enregistre le fichier numérique dans une mémoire de masse 33, par exemple sous la forme d'un fichier son au format .WAV. Ce fichier peut 20 éventuellement subir un traitement numérique, comme par exemple une amplification numérique pour calibrage du niveau de signal, un filtrage pour l'élimination de fréquences non désirées, ou être transformé en son spectre par une transformée de FOURIER discrète, de préférence par l'algorithme de transformée de FOURIER rapide (FFT en terminologie anglo-saxonne).

Le temps de reproduction sonore peut être augmenté en répétant 25 dans un fichier plusieurs fois un fragment ou la totalité du fichier son original.

Sur commande, le fichier éventuellement traité est transformé par un convertisseur numérique-analogique 41 de la carte 25 (ou d'une carte séparée), qui délivre sur la sortie 9' le signal électromagnétique analogique caractéristique de l'activité biologique à appliquer, selon le procédé d'amplification conforme à

l'Invention, par exemple à un aliquote 43 d'un premier réactif et à un aliquote 45 d'un deuxième réactif, comme illustré sur la Figure 5.

Avantageusement, l'application du signal à ces aliquotes est réalisée préalablement à leur mélange. Le support sur lequel sont déposés ces aliquotes, par exemple, une lame 47 munie d'un capillaire 49 en forme de serpentin, est disposé dans un champ électromagnétique rayonné par un transducteur 51, typiquement une bobine dont une première extrémité 9, 9' est reliée à la sortie 9 d'un dispositif d'acquisition des Figures 1 ou 2 ou à la sortie 9' d'un dispositif d'enregistrement des Figures 3 ou 4. L'extrémité de la bobine opposée à la borne de connexion 9, 9' est, par exemple, connectée à la masse 11.

Sans que cela représente un quelconque caractère limitatif, le transducteur 51 comporte avantageusement une bobine, d'axe horizontal permettant l'introduction de la lame 47. La bobine a, par exemple, une longueur de 120 mm, un diamètre interne de 25 mm, un diamètre extérieur de 28 mm, présente 631 tours d'un fil de diamètre 0,5mm et une résistance de 4,7 Ω.

Avantageusement, le signal électrique appliqué sur cette bobine 51 aura une amplitude de 2 volts efficaces.

**EXAMPLE 1 : AMPLIFICATION DE LA FORMATION D'AGGLUTINATS
ENTRE L'ANTIGENE POLYSACCHARIDIQUE D'ESCHERICHIA COLI K1
ET UN ANTICORPS DIRIGE CONTRE CET ANTIGENE**

Le procédé d'amplification conforme à l'Invention a été validé en testant les effets, sur une réaction d'agglutination entre l'antigène polysaccharidique d'*Escherichia coli* K1 et un anticorps dirigé contre cet antigène :

- de l'application du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'une substance antigénique étrangère à cette réaction telle que *Streptococcus*,
- de l'application du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'*Escherichia coli*,

- de l'application simultanée du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de *Streptococcus* et du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'un anticorps dirigé contre *Escherichia coli*, et enfin

5 - de l'application simultanée du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'*Escherichia coli* et du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'un anticorps dirigé contre cet antigène.

1) Réalisation des tests :

10 a) Acquisition des signaux électromagnétiques :

L'acquisition des signaux électromagnétiques caractéristiques des activités biologiques de *Streptococcus*, d'*Escherichia coli* et de son anticorps spécifique a été réalisée au moyen du matériel d'enregistrement de la Figure 2.

15 L'acquisition du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de *Streptococcus* a été effectuée en plaçant au centre de l'enceinte 13 un tube contenant 1 ml d'une suspension aqueuse de bactéries *Streptococcus* préalablement formolées (6.10^6 bactéries/ml).

20 L'acquisition des signaux électromagnétiques caractéristiques de l'activité biologique d'*Escherichia coli* et de son anticorps spécifique a été réalisée en opérant de la même manière, mais en utilisant respectivement :

- un tube contenant 1 ml d'une suspension aqueuse de bactéries *Escherichia coli* préalablement formolées (6.10^6 bactéries/ml) ; et

25 - un tube contenant 1 ml d'une suspension de particules d'un latex sensibilisé par un anticorps monoclonal de souris spécifique d'*Escherichia coli* K1, provenant d'une trousse PASTOREX® MENINGITIS (Référence 61709 - SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR).

b) Préparation des réactifs de la réaction d'agglutination :

Les tests ont été réalisés en utilisant comme réactifs :

30 - d'une part, une solution d'antigène polysaccharidique d'*Escherichia coli* K1 préparée par dissolution d'un extrait antigénique provenant

d'une trousse PASTOREX® MENINGITIS (Référence 61709 - SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR) dans 1 ml d'eau distillée et stérile, puis dilution au 1/7, 1/7,5 ou 1/8 dans du sérum physiologique ; et

5 – d'autre part, le latex sensibilisé par un anticorps monoclonal de souris spécifique de l'anticorps *d'Escherichia coli* K1 présent dans cette même trousse, après dilution au 1/3 dans du sérum physiologique.

c) Application des signaux électromagnétiques à la réaction d'agglutination :

Pour chacun des tests, on a utilisé le protocole suivant :

10 – on place dans une étuve chauffée à 37°C un transducteur constitué par une bobine mesurant 120 mm de long et 25 mm de diamètre interne, présentant 631 tours et une résistance de 4,7 Ω, et reliée à la sortie 9' du convertisseur numérique-analogique 41 d'une carte Soundblaster d'un ordinateur 23 restituant les fichiers d'enregistrement constitué par les signaux électromagnétiques que l'on souhaite appliquer, le temps nécessaire pour amener ce transducteur à la température 15 de 37°C ;

20 – on dépose sur une lame munie d'un capillaire en forme de serpentin (de type de celles fournies dans les kits PASTOREX MENINGITIS), à faible distance de l'ouverture de ce dernier, une goutte (soit 40 à 50 µl) de la solution antigénique telle que décrite au point b) ci-avant, ainsi qu'une goutte (correspondant également à un volume de 40 à 50 µl) du latex sensibilisé par l'anticorps, en prenant garde à ce que ces gouttes ne se mélangent pas ;

25 – on applique, aux deux gouttes de réactifs ainsi déposées, le ou les signaux électromagnétiques désirés en plaçant la lame au centre du transducteur pendant environ 2 mn et en restituant un fichier son à l'aide de l'ordinateur 23 de la Figure 4 ;

 – on mélange les deux gouttes de réactifs pendant environ 10 secondes et on laisse pendant environ 13 minutes dans l'étuve le mélange réactionnel migrer dans le capillaire et la réaction d'agglutination se produire ;

30 – on sort alors la lame de l'étuve et on procède à une lecture de cette agglutination.

Comme visible sur la Figure 10, cette lecture est réalisée par analyse, au moyen d'un logiciel d'analyse et de traitement d'images implémenté sur un ordinateur de type PC 23' tournant sous le système d'exploitation WINDOWS® 95 (MICROSOFT), d'une image acquise à l'aide d'une caméra vidéo 53 positionnée sur 5 un microscope optique 55 et connectée audit ordinateur par une carte d'acquisition vidéo 57. La caméra 53 travaille en niveaux de gris. Un premier traitement augmentant le contraste, le seuil étant réglé de manière à ce que les agglutinats apparaissent en noir, tandis que les zones dépourvues de particules de latex ou d'agglutinats apparaissent en blanc.

10 A partir de l'analyse de la répartition spatiale bidimensionnelle des zones sombres de l'image, l'ordinateur détermine un index d'agglutination (I) calculé selon la formule :

$$I = \frac{\text{Surface occupée par les agglutinats de taille supérieure à 60 pixels}}{\text{Surface occupée par les agglutinats de taille égale ou inférieure à 60 pixels}}$$

15 Cet index d'agglutination est d'autant plus élevé que la taille des agglutinats formés au cours de la réaction d'agglutination est plus importante. L'amplification est considérée comme positive lorsque, lors d'une expérience, 20 l'application des signaux électromagnétiques caractéristiques de l'activité biologique d'*Escherichia coli* et/ou de l'activité biologique de son anticorps spécifique conduit à l'obtention d'index d'agglutination au moins supérieurs de 40% à l'index d'agglutination maximal obtenu, dans les mêmes conditions, et sur par exemple 3 expériences, après application du signal électromagnétique caractéristique de l'activité 25 biologique de *Streptococcus*.

2) Résultats :

Le Tableau 1 ci-après présente les index d'agglutination (I) obtenus dans une première série de tests visant à comparer les effets de l'application du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'*Escherichia coli* à ceux 30 observés après application, dans les mêmes conditions réactionnelles, du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de *Streptococcus*, et ce, pour

3 dilutions différentes (1/7, 1/7,5 et 1/8) de la solution d'antigène polysaccharidique d'*Escherichia coli* K1 utilisée comme réactif dans les réactions d'agglutination.

TABLEAU 1

Dilution de la solution d'antigène <i>E. coli</i> K1	Index d'agglutination (I)	
	Signal <i>Streptococcus</i>	Signal <i>E. coli</i>
1/7	11	173
	6	52
	16	154
1/7,5	58	141
	32	117
	12	107
1/8	10	113
	6	37
	8	21

5

Par ailleurs, les Figures 6 et 7 montrent, à titre d'exemples, des images des agglutinats formés d'une part, après application du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de *Streptococcus* (Figure 6) et, d'autre part, après application du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'*Escherichia coli* (Figure 7). Ces images correspondent respectivement aux index d'agglutination de 32 et de 117 qui sont rapportés à la 5ème ligne de résultats du Tableau 1.

Le Tableau 2 ci-dessous présente, quant à lui, les index d'agglutination (I) obtenus dans une deuxième série d'expérimentations dans le cadre de laquelle les effets de l'application simultanée du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'*Escherichia coli* et du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'anticorps dirigé contre *Escherichia coli*, ont été comparés à ceux de l'application simultanée, dans les mêmes conditions réactionnelles, du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de *Streptococcus* et du signal électromagnétique caractéristique de l'activité

biologique de l'anticorps dirigé contre *Escherichia coli* et ce, pour 2 dilutions différentes (1/7 et 1/7,5) de la solution d'antigène polysaccharidique d'*Escherichia coli* K1 utilisée comme réactif.

TABLEAU 2

5

Dilution de la solution d'antigène <i>E. coli</i> K1	Index d'agglutination (I)	
	Signal <i>Streptococcus</i> + Signal anticorps anti- <i>E. coli</i>	Signal <i>E. coli</i> + Signal anticorps anti- <i>E. coli</i>
1/7	18 71	94 247
1/7,5	48 93	212 1141

Les Figures 8 et 9 montrent, également à titre d'exemples, des images des agglutinats qui correspondant respectivement aux index d'agglutination de 71 et de 247 rapportés à la 2ème ligne de résultats du Tableau 2.

10 Tous ces résultats mettent clairement en évidence l'aptitude que présente le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'un élément d'un couple ligand/récepteur, à amplifier la formation des complexes formés par la réaction entre ce ligand et ce récepteur et ce, de manière très spécifique, puisque le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'un élément biologiquement actif, mais étranger à cette réaction ne produit, lui, pas d'effet 15 d'amplification.

15 Ils montrent également que cette amplification est d'autant plus prononcée que l'on applique, aux deux éléments du couple ligand/récepteur, à la fois le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de ce ligand et le 20 signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de ce récepteur.

EXEMPLE 2 : DETECTION DE LA PRESENCE D'ESCHERICHIA COLI DANS UN ECHANTILLON

L'intérêt de l'utilisation du procédé d'amplification conforme à l'Invention pour la détection d'une substance présente dans un échantillon analytique 5 a été vérifiée en effectuant une série de tests visant à comparer les effets de l'application, sur une réaction d'agglutination entre l'antigène polysaccharidique d'*Escherichia coli* K1 et un anticorps monoclonal de souris spécifique de cet antigène identique à celle mise en œuvre dans l'exemple 1 ci-avant, du signal électromagnétique capté à partir d'un échantillon d'un produit 10 alimentaire, en l'espèce une compote de pommes, préalablement contaminé par des bactéries *Escherichia coli*, avec ceux obtenus lors de l'application, dans les mêmes conditions réactionnelles, du signal électromagnétique capté à partir d'un échantillon témoin, c'est-à-dire non contaminé, du même produit alimentaire.

1) Réalisation des tests :

15 L'acquisition des signaux électromagnétiques des échantillons de compote de pommes (échantillons témoins et échantillons contaminés) a été réalisée au moyen du matériel d'enregistrement de la Figure 2, en plaçant au centre de l'enceinte 13 :

20 – dans le cas des échantillons témoins, un tube contenant 1 ml de compote préalablement diluée au 1/2 avec du sérum physiologique, et

– dans le cas des échantillons contaminés, un tube contenant 1 ml de compote préalablement diluée au 1/2 avec du sérum physiologique et contaminée, par addition de bactéries *Escherichia coli* préalablement formolées, à raison de 3.10^6 bactéries par ml de compote diluée.

25 Les tests ont été réalisés en utilisant comme réactifs :

– d'une part, une suspension contenant des bactéries *Escherichia coli* préalablement formolées dans du sérum physiologique, à raison de 10^7 bactéries/ml, et

- d'autre part, le latex sensibilisé par un anticorps monoclonal de souris spécifique de l'anticorps d'*Escherichia coli* K1 présent dans cette même trousse, après dilution au 1/3 dans du sérum physiologique,
 et en suivant un protocole opératoire identique à celui décrit au paragraphe c) de
 5 l'exemple 1 ci-avant.

2) Résultats :

Le Tableau 3 ci-après présente les index d'agglutination (I) obtenus dans trois séries de tests.

TABLEAU 3

10

Tests	Index d'agglutination (I)	
	Echantillons témoins	Echantillons contaminés
Série 1	10	42
	25	93
	27	104
Série 2	14	30
	17	153
	46	40
Série 3	19	54
	34	314

Comme visible sur le Tableau 3, la taille des agglutinats formés au cours de la réaction entre l'antigène polysaccharidique d'*Escherichia coli* K1 et son anticorps spécifique est substantiellement plus élevée dans le cas où le signal électromagnétique appliqué au cours de cette réaction a été capté à partir d'un échantillon de compote de pommes contaminé par des bactéries *Escherichia coli*.
 15

Ces résultats montrent que le procédé d'amplification conforme à l'Invention peut avantageusement être utilisé pour détecter la présence, dans un échantillon analytique, d'une substance biologiquement active telle qu'une bactérie, 20 même lorsque cet échantillon présente une composition complexe, c'est-à-dire qu'il

renferme, comme dans le cas des échantillons de compote de pommes, de nombreuses autres substances biologiquement actives.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'Invention ne se limite nullement aux formes de réalisation qui viennent d'être décrites de façon plus 5 explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écartez du cadre, ni de la portée de la présente Invention.

REVENDICATIONS

1. Procédé d'amplification d'une réaction entre les deux éléments d'un couple ligand/récepteur, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact des deux éléments du couple ligand/récepteur dans des conditions propres à permettre leur réaction, et
- préalablement, simultanément ou postérieurement à cette mise en contact, l'application à l'un et/ou l'autre de ces éléments du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'un et/ou l'autre desdits éléments.

2. Procédé d'amplification selon la revendication 1, caractérisé en ce que la réaction entre le ligand et le récepteur est réalisée en mettant en contact deux réactifs contenant respectivement le ligand et le récepteur, et on applique, à l'un et/ou l'autre de ces réactifs, un signal électromagnétique à tester et suspecté comprendre le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de ce ligand et/ou de ce récepteur.

15 3. Procédé d'amplification selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'application, à l'un et/ou l'autre des réactifs, du signal électromagnétique à tester est réalisée par exposition d'une solution ou d'une suspension contenant l'un ou l'autre de ces réactifs à ce signal électromagnétique.

20 4. Procédé d'amplification selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'application, à l'un et/ou l'autre des réactifs, du signal électromagnétique à tester est réalisée par dilution d'une solution ou d'une suspension comprenant l'un et/ou l'autre de ces réactifs, dans un solvant ayant été préalablement exposé à ce signal électromagnétique.

25 5. Procédé d'amplification selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'application, à l'un et/ou l'autre des réactifs, du signal électromagnétique à tester est réalisée par dissolution ou mise en suspension de ce ou ces réactifs dans un solvant ayant été préalablement exposé à ce signal électromagnétique.

6. Procédé d'amplification selon la revendication 4 ou la revendication 5, caractérisé en ce que le solvant ayant été préalablement exposé au

signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'échantillon à analyser est de l'eau ou du soluté physiologique.

7. Procédé d'amplification selon l'une quelconque des revendications 2 à 6, caractérisé en ce que le signal électromagnétique à tester est le signal électromagnétique capté à partir d'un échantillon à analyser et suspecté contenir le ligand et/ou le récepteur.

8. Procédé d'amplification selon l'une quelconque des revendications 2 à 6, caractérisé en ce que le signal électromagnétique à tester est le signal électromagnétique rayonné par une source de rayonnement électromagnétique.

9. Procédé d'amplification selon la revendication 1, caractérisé en ce que la réaction entre le ligand et le récepteur est réalisée en mettant en contact un échantillon à analyser et suspecté contenir le ligand et/ou le récepteur, avec un réactif contenant soit le récepteur, soit le ligand, et on applique, à cet échantillon et/ou à ce réactif, le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique dudit ligand et/ou dudit récepteur.

10. Procédé d'amplification selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'application, à l'échantillon à analyser, du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique du ligand et/ou du récepteur est réalisé par exposition de cet échantillon à ce ou ces signaux électromagnétiques, ou par dilution de cet échantillon dans un solvant ayant été préalablement exposé au(x)dit(s) signal(aux) électromagnétiques.

11. Procédé d'amplification selon la revendication 9 ou la revendication 10, caractérisé en ce que l'application, au réactif destiné à réagir avec l'échantillon à analyser, du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique du ligand et/ou du récepteur est réalisée par exposition d'une solution ou d'une suspension contenant ce réactif à ce ou ces signaux électromagnétiques, ou par dilution d'une telle solution ou suspension dans un solvant ayant été préalablement exposé à ce ou ces signaux électromagnétiques, ou encore par dissolution ou mise en suspension de ce réactif dans un solvant ayant été préalablement exposé au(x)dit(s) signal(aux) électromagnétiques.

12. Procédé d'amplification selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'on applique, à l'échantillon à analyser et au réactif destiné à réagir avec lui, le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique du ligand et/ou du récepteur, par exposition d'une solution ou d'une suspension contenant cet échantillon et ce réactif à ce ou ces signaux électromagnétiques, ou par dilution d'une telle solution ou suspension dans un solvant ayant été préalablement exposé au(x)dit(s) signal(aux) électromagnétique(s).

13. Procédé d'amplification selon l'une quelconque des revendications 9 à 12, caractérisé en ce qu'on applique, à l'échantillon à analyser et/ou au réactif destiné à réagir avec lui, à la fois le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique du ligand et le signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique du récepteur.

14. Procédé d'amplification selon l'une quelconque des revendications 10 à 12, caractérisé en ce que le solvant ayant été préalablement exposé au(x) signal(aux) électromagnétique(s) est avantageusement de l'eau ou du soluté physiologique.

15. Procédé d'amplification selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce qu'il comprend une étape d'acquisition du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'un et/ou l'autre des éléments du couple ligand/récepteur.

16. Procédé d'amplification selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il comprend une étape d'enregistrement et de restitution d'une information représentative du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'un et/ou l'autre des éléments du couple ligand/récepteur.

17. Procédé d'amplification selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de détection et, éventuellement, de mesure des complexes résultant de la réaction entre le ligand et le récepteur.

18. Procédé d'amplification selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, caractérisé en ce que le ligand est un antigène ou un haptène,

tandis que le récepteur est un anticorps ou un récepteur membranaire dirigé spécifiquement contre ce ligand.

19. Procédé d'amplification selon la revendication 18, caractérisé en ce que la réaction entre l'antigène et l'anticorps ou l'haptène et l'anticorps est révélée par agglutination.

20. Procédé de détection de la présence d'une substance correspondant à l'un des deux éléments d'un couple ligand/récepteur dans un échantillon analytique, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en oeuvre d'un procédé d'amplification selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 et 9 à 19.

10 21. Procédé de détection selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact de deux réactifs contenant respectivement le ligand et le récepteur, dans des conditions propres à permettre leur réaction,
- préalablement, simultanément ou postérieurement à cette mise en contact, l'application, à l'un et/ou l'autre de ces réactifs, du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique de l'échantillon analytique, et
- la détection et/ou la mesure des complexes ligands-récepteurs formés au cours de la réaction entre les deux réactifs.

22. Procédé de détection selon la revendication 21, caractérisé en ce que les concentrations du ligand et du récepteur sont choisies de manière à être suffisantes pour conduire à l'obtention de complexes ligands-récepteurs détectables en l'absence de l'application du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique dudit échantillon, mais inférieures aux concentrations susceptibles d'aboutir à une saturation de la réaction entre ce ligand et ce récepteur.

25 23. Procédé de détection selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact de l'échantillon analytique avec un réactif contenant soit le récepteur, si la substance recherchée dans l'échantillon est le ligand, soit le ligand, si la substance recherchée dans l'échantillon est le récepteur, dans des conditions propres à permettre leur réaction,

– préalablement, simultanément ou postérieurement à cette mise en contact, l'application, à cet échantillon et/ou ce réactif, du signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique du ligand et/ou du récepteur, et

5 – la détection et/ou la mesure des complexes ligands-récepteurs éventuellement formés.

24. Appareil de détection de la présence d'une substance correspondant à l'un des deux éléments d'un couple ligand/récepteur dans un échantillon analytique, caractérisé en ce qu'il met en œuvre un procédé selon la revendication 20 et en ce qu'il comporte :

10 a) des moyens (47) de réception de l'échantillon analytique et d'un réactif contenant soit le récepteur, soit le ligand, permettant leur mise en contact dans des conditions propres à permettre leur réaction ;

b) une source (5, 9, 9', 19) de signal électromagnétique caractéristique de l'activité du ligand et/ou du récepteur ;

15 c) des moyens (51) d'application du signal délivré par ladite source (5, 9, 9', 19) de signal électromagnétique à l'échantillon et/ou le réactif ; et

d) des moyens (53, 55, 57) de détection et/ou de mesure des complexes ligands-récepteurs formés au cours de la réaction entre l'échantillon et le réactif.

20 25. Appareil de détection de la présence d'une substance correspondant à l'un des deux éléments d'un couple ligand/récepteur dans un échantillon analytique, caractérisé en ce qu'il met en œuvre un procédé selon la revendication 20 et en ce qu'il comporte :

25 a) des moyens (47) de réception de deux réactifs contenant respectivement le ligand et le récepteur, permettant leur mise en contact dans les conditions propres à permettre leur réaction ;

b) des moyens d'acquisition d'un signal électromagnétique de l'échantillon analytique ;

c) des moyens (51) d'application du signal délivré par lesdits moyens d'acquisition (5, 9, 9', 19) de signal électromagnétique à l'un et/ou l'autre des réactifs ; et

5 d) des moyens (53, 55, 57) de détection et/ou de mesure des complexes ligands-récepteurs formés en cours de la réaction entre les deux réactifs.

26. Appareil selon la revendication 24 ou la revendication 25, caractérisé en ce que les moyens de détection comportent des moyens de détection optique.

10 27. Appareil selon l'une quelconque des revendications 24 à 26 caractérisé en ce qu'il comporte une enceinte (13) munie d'un blindage électrique et magnétique entourant lesdits moyens de réception (47).

28. Application d'un procédé de détection de la présence d'une substance dans un échantillon analytique selon l'une quelconque des revendications 20 à 23 au diagnostic biologique en médecine humaine ou vétérinaire.

15 29. Application d'un procédé de détection de la présence d'une substance dans un échantillon analytique selon l'une quelconque des revendications 20 à 23 au contrôle bactériologique dans l'industrie pharmaceutique, l'industrie cosmétique, les productions et industries alimentaires.

20 30. Procédé de détection de la présence, dans un signal électromagnétique à tester, d'un signal électromagnétique caractéristique de l'activité biologique d'une substance correspondant à l'un des deux éléments d'un couple ligand/récepteur, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en oeuvre d'un procédé d'amplification selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 et 15 à 19.

25 31. Procédé de détection selon la revendication 30, caractérisé en ce que le signal électromagnétique est le signal électromagnétique rayonné par une source de rayonnement électromagnétique.

1 / 7

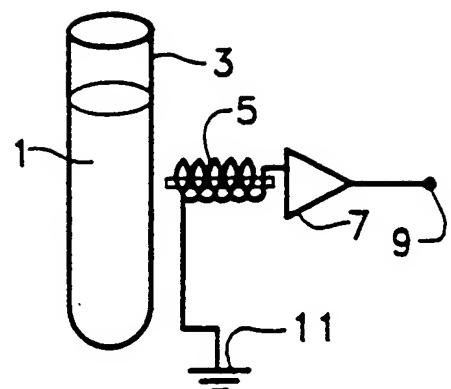


FIG. 1

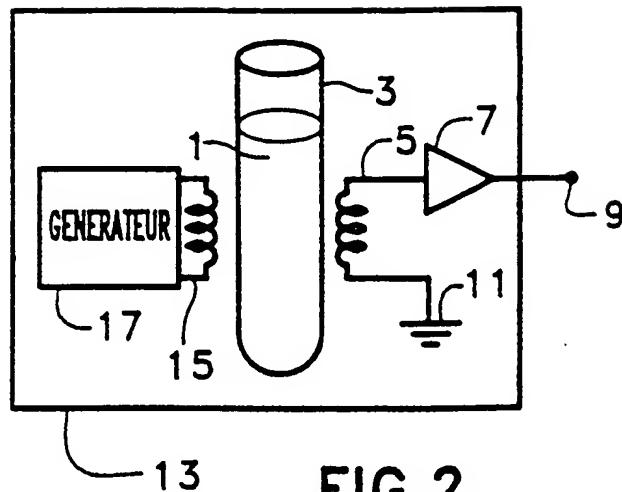


FIG. 2

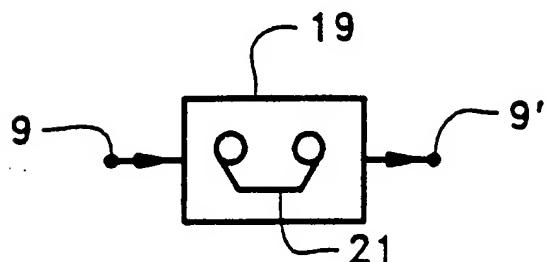


FIG. 3

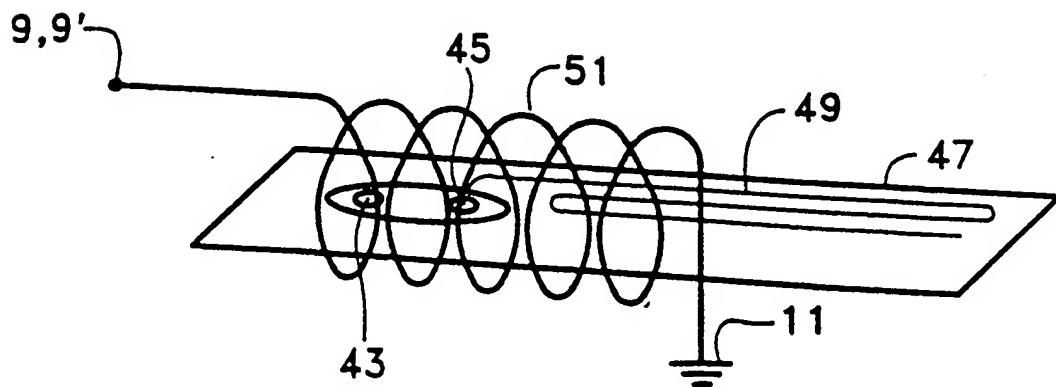


FIG. 5

217

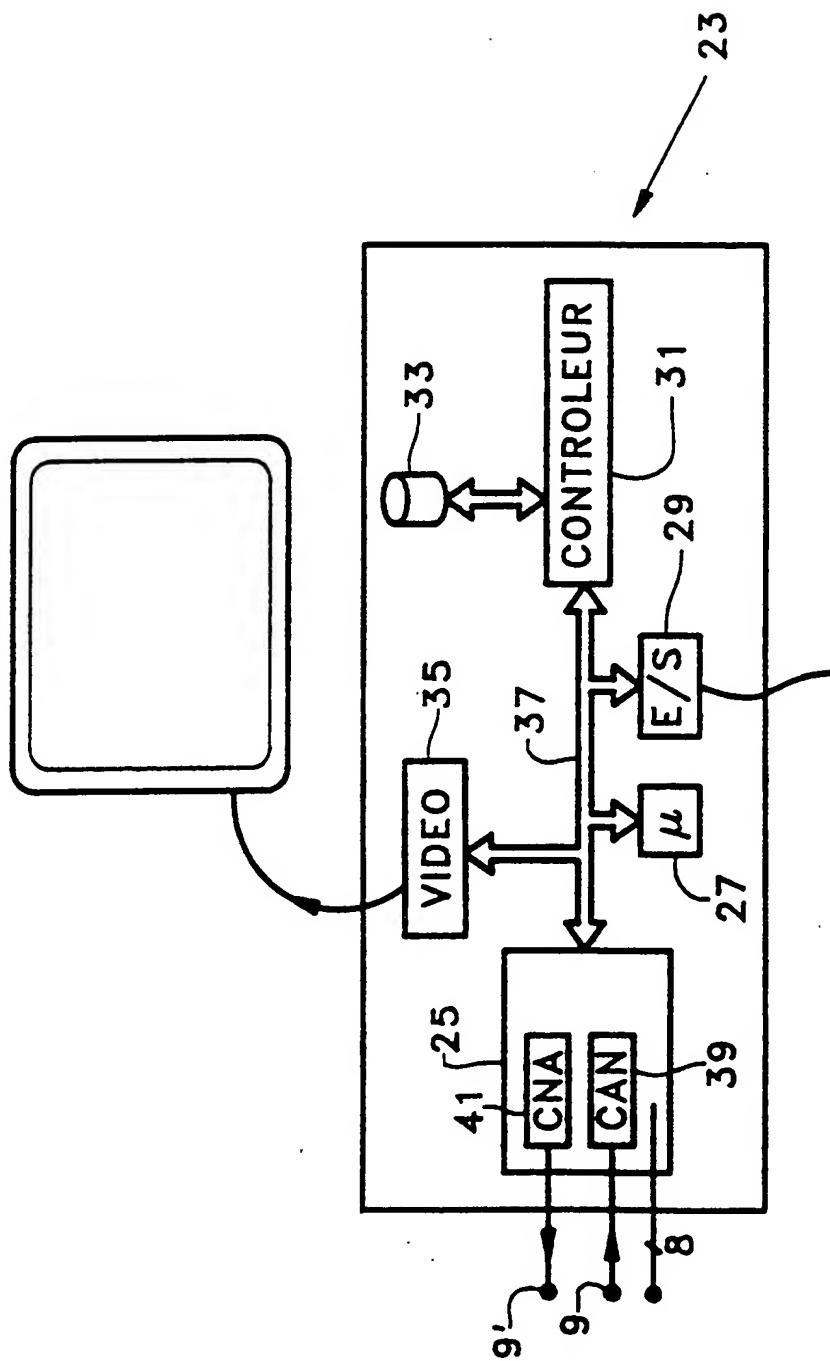


FIG.4

3 / 7

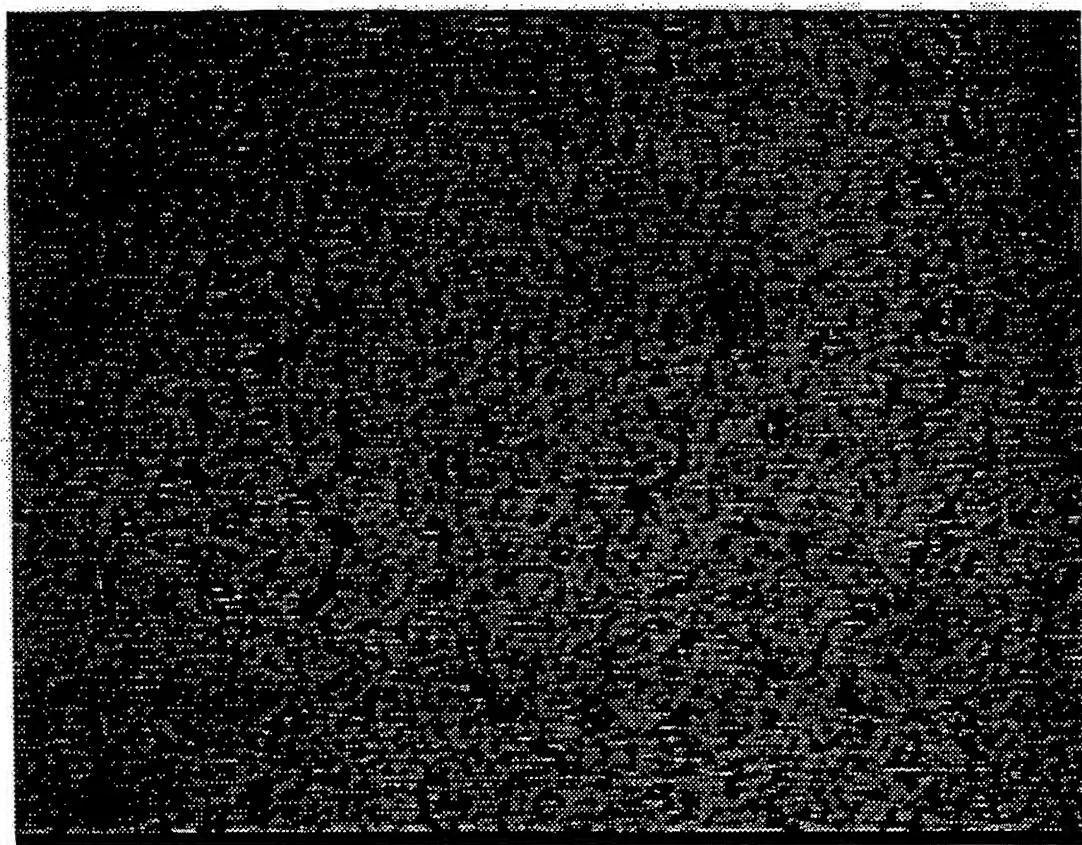


Fig. 6

4 / 7

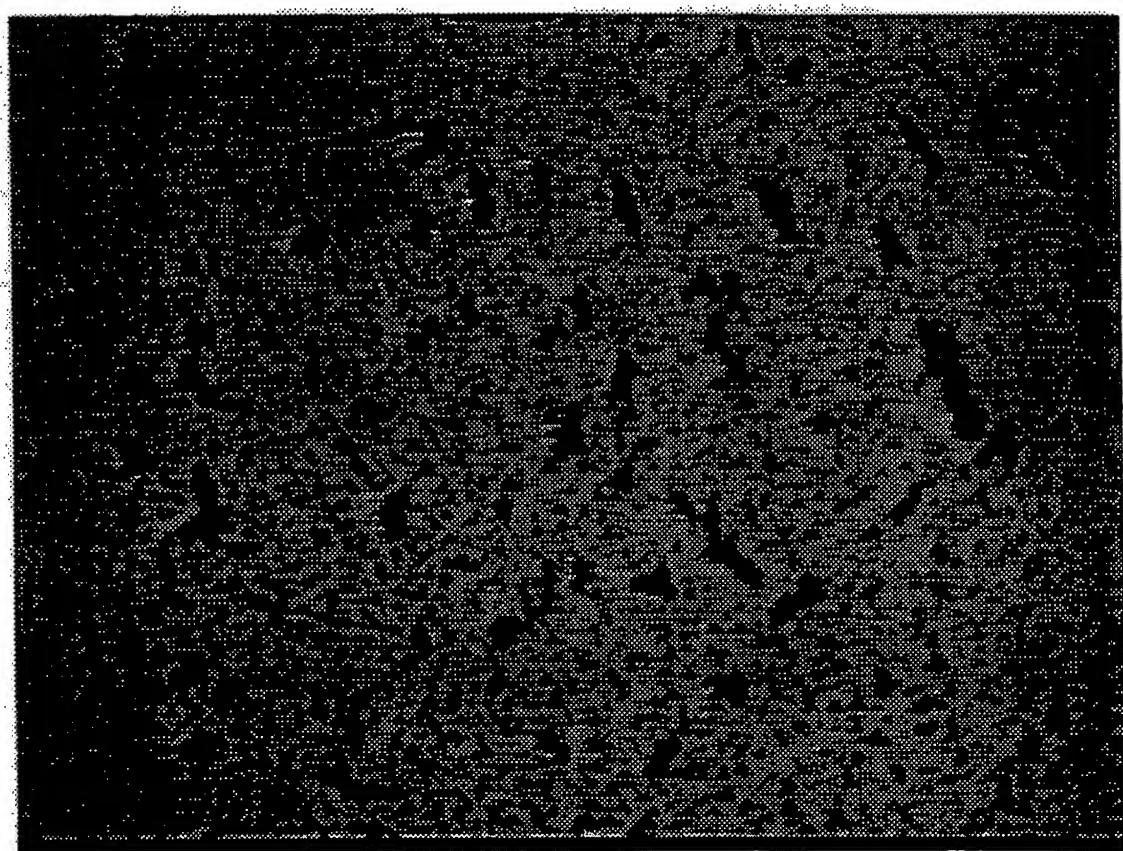


Fig. 7

5 / 7

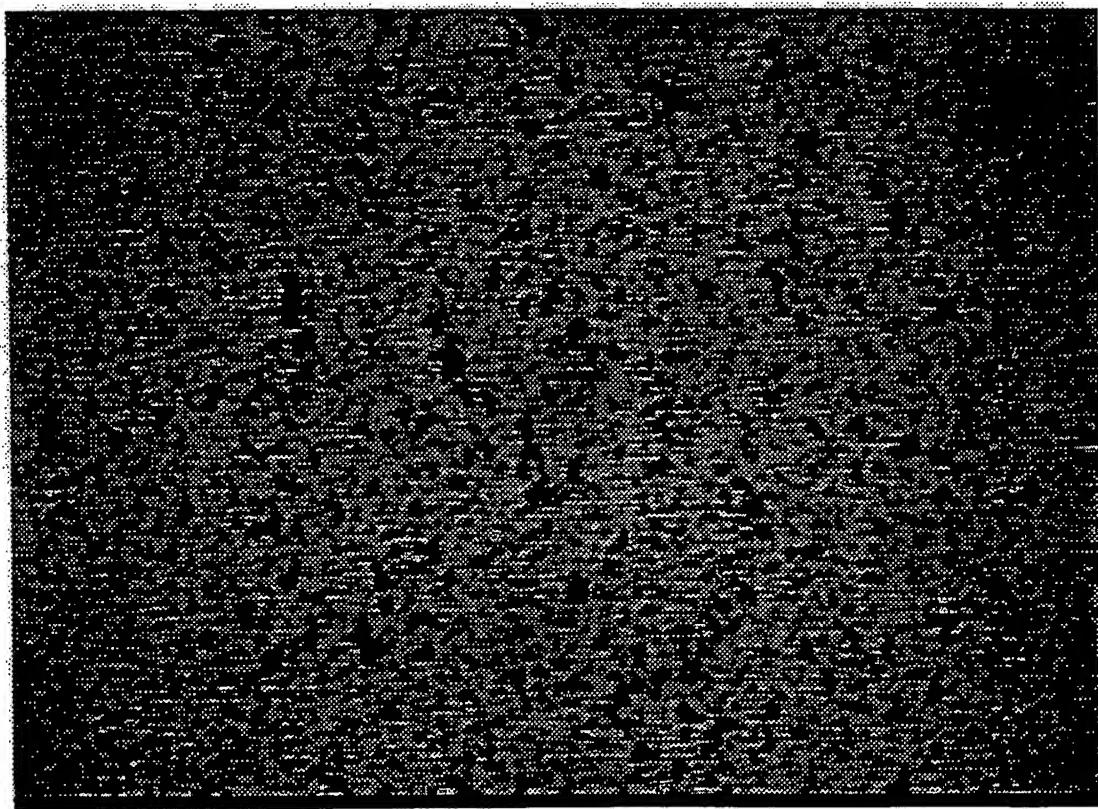


Fig . 8

6 / 7

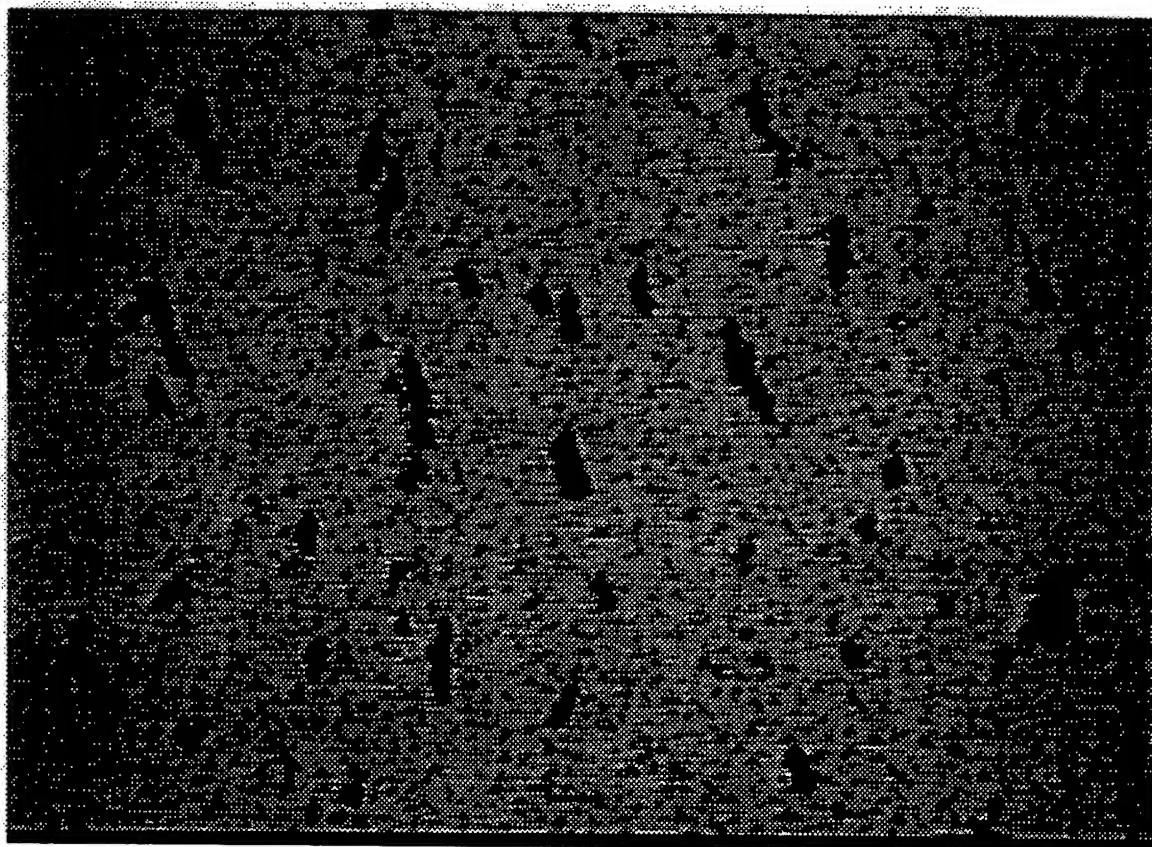


Fig. 9

7 / 7

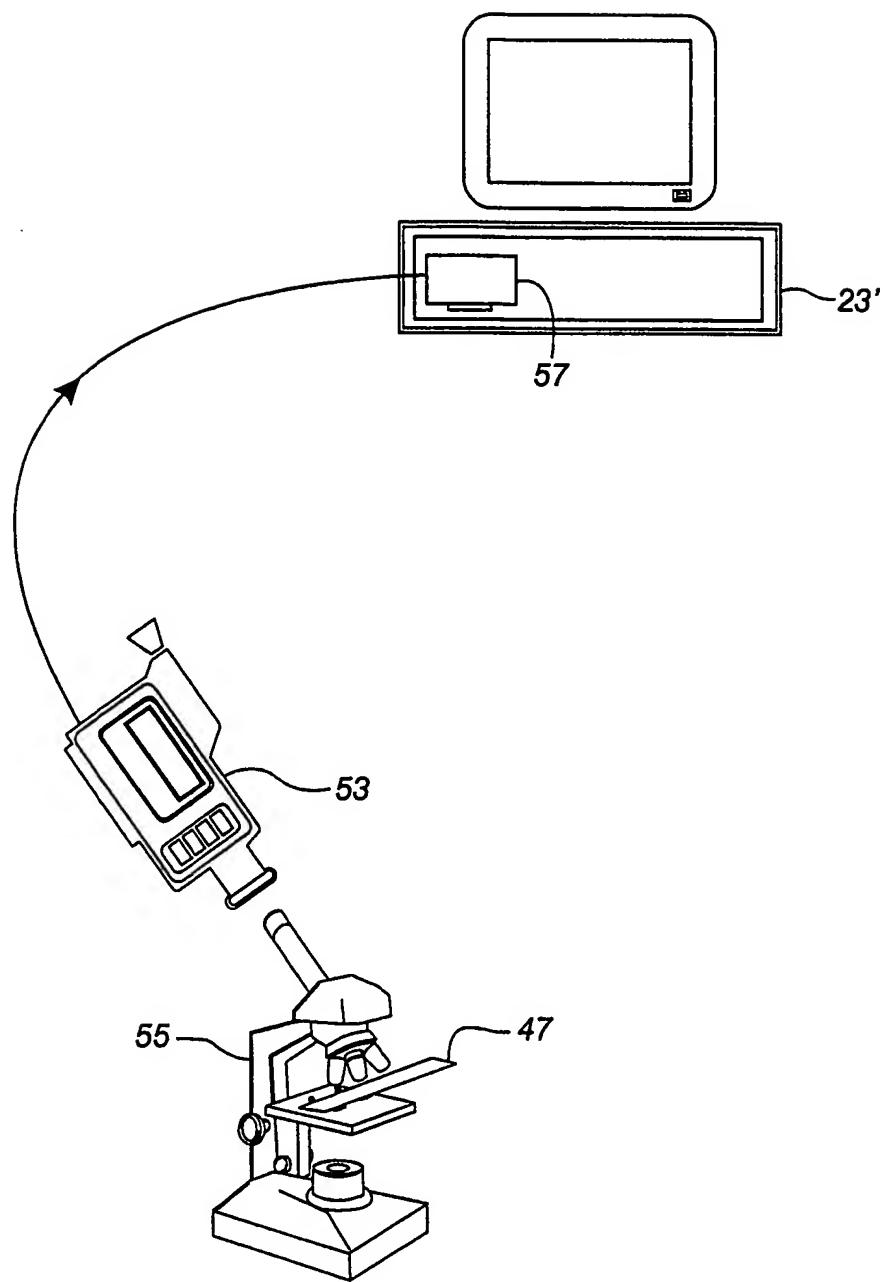


Fig. 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Appl. No.

PCT/FR 99/00915

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/483 G01N33/487

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbol(s))

IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 700 628 A (J. BENVENISTE) 22 July 1994 (1994-07-22) the whole document & WO 94 17406 A cited in the application -----	1-31
A	FR 2 634 381 A (J.-B. J. C. MOREZ) 26 January 1990 (1990-01-26) -----	

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 July 1999

Date of mailing of the international search report

09/08/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Griffith, G

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/00915

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
FR 2700628	A 22-07-1994	AU 5887994 A	EP 0701695 A	WO 9417406 A	15-08-1994 20-03-1996 04-08-1994
FR 2634381	A 26-01-1990	NONE			

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem Internationale No

PCT/FR 99/00915

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
 CIB 6 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/483 G01N33/487

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 700 628 A (J. BENVENISTE) 22 juillet 1994 (1994-07-22) le document en entier & WO 94 17406 A cité dans la demande ----	1-31
A	FR 2 634 381 A (J.-B. J. C. MOREZ) 26 janvier 1990 (1990-01-26) -----	



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

30 juillet 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

09/08/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Griffith, G

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2700628	A 22-07-1994	AU 5887994 A EP 0701695 A WO 9417406 A	15-08-1994 20-03-1996 04-08-1994
FR 2634381	A 26-01-1990	AUCUN	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.